

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004 年 10 月 21 日 (21.10.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/089401 A1(51) 国際特許分類:
38/19, 47/42, A61P 9/00, 9/10

A61K 38/18,

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(21) 国際出願番号:

PCT/JP2003/004165

(22) 国際出願日:

2003 年 4 月 1 日 (01.04.2003)

(25) 国際出願の言語:

日本語

(26) 国際公開の言語:

日本語

(71) 出願人 および

(72) 発明者: 田畑 泰彦 (TABATA, Yasuhiko) [JP/JP]; 〒611-0024 京都府宇治市琵琶台 3-8-16 Kyoto (JP). 米田 正始 (KOMEDA, Masashi) [JP/JP]; 〒602-8024 京都府京都市上京区室町通樫木町下ル大門町 2 5 6 Kyoto (JP).

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ユーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

(74) 代理人: 津国 肇 (TSUKUNI, Hajime); 〒105-0001 東京都港区虎ノ門 1 丁目 2 番 1 2 号 SVAXTSビル Tokyo (JP).

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: REMEDY FOR ISCHEMIA

(54) 発明の名称: 虚血治療剤

(57) Abstract: It is intended to provide a remedy which is useful in treating ischemia accompanying peripheral circulatory disorders, etc. encountering as complications of arteriosclerosis obliterans, Buerger's disease, diabetes and collagen disease. A remedy for ischemia which contains an angiogenesis inducer and a gelatin hydrogel and sustainedly releases the angiogenesis inducer.

(57) 要約: 閉塞性動脈硬化症、パージャール病、及び糖尿病及び膠原病に合併する末梢循環不全等に伴う虚血の治療に有用な治療剤を提供する。血管新生誘導因子及びゼラチンハイドロゲルを含み、血管新生誘導因子が徐放される、虚血治療剤。

WO 2004/089401 A1

明 細 書

虚血治療剤

技術分野

- 5 本発明は、血管新生誘導因子及びゼラチンハイドロゲルを含み、血管新生誘導因子が徐放される、虚血治療剤に関する。

背景技術

- 10 血管外科領域においては、閉塞性動脈硬化症や閉塞性血栓性脈管炎（ビュルガー病、バージャー病）、膠原病等に付随する末梢血管炎等に由来する重症の上肢又は下肢虚血の症例が、数多く報告されている。

重症上肢又は下肢虚血疾患は、それ自体では致死的な疾患ではないが、結果として生じる上肢又は下肢の切断は、患者に重度の精神的、肉体的苦痛を与える。

- 15 さらに、四肢における虚血の重症化は、単に血行を悪くするのみならず、患部における創傷治癒遅延、難治性の感染症、たとえば、人工血管を用いるバイパス手術を受けた患者におけるその人工血管への感染の原因となり、最終的には、致死的な結果をもたらす場合すらある。

しかし、これらに対する治療法として、十分な治療効果が得られるものは、現在までのところ、知られていない。

- 20 外科的治療法としては、下肢血行再建術が、知られている。また、その適用範囲は、従来は適用が困難であった高齢者や他臓器疾患を併発した患者に対しても拡大される傾向にある。しかし、診断技術の向上により患者人口の増加により数多くの血行再建不能例が、報告されるようになり、最終的に上肢又は下肢の切断に至る例すら報告されている。すなわち、外科的治療法による治療効果は、重症
25 例においては四肢の温存期間を多少延長することができるにとどまり、また、その治療成績も、極めて悪い治療法である。

一方、内科的治療法としては、血管拡張剤等の循環改善薬の投与による側副血行の促進が主であるが、十分な効果が得られる治療法は、現在のところ、知られていない。

最近、血管新生誘導因子を用いる虚血性疾患の治療法が開発されてきている。

血管新生誘導因子（血管新生促進因子）は、成熟個体においては、創傷治癒、固形ガンの増殖・転移、慢性炎症、網膜症などの病態の進展過程において見られる。この因子は、既存の毛細血管後細静脈の基底膜の破壊、破壊局所からの血管内皮細胞の発芽、血管外への遊走・増殖、管腔形成の諸過程を促進し、新たな毛細血管や小血管の形成を促進する活性を有する。代表的なものとして、塩基性線維芽細胞増殖因子(basic fibroblast growth factor: b F G F)血管内皮細胞増殖因子(V E G F、vascular endothelial growth factor)、肝細胞増殖因子(H G F、hepatocyte growth factor)、アンジオポエチン、血小板由来増殖因子(P D G F、platelet derived growth factor)、エフリンなどがある。

b F G Fは、欧米においては、虚血性心疾患治療において、臨床治療レベルで使用されている。また、b F G Fは、本邦においても、皮膚科領域において臨床応用レベルで、整形外科領域において臨床治験レベルで使用されている。

V E G FやH G Fなどの遺伝子を用いる虚血性疾患の治療法も開発されている。この治療法は、遺伝子を主に筋肉内に投与し、筋肉内の細胞に遺伝子を取り込ませ、それによって遺伝子導入細胞から導入遺伝子の発現産生物であるタンパク質を分泌させるものである。この方法の特徴は、細胞を用いる徐放化、すなわち、血管新生誘導因子の徐放化を細胞に行わせる点にある。しかしながら、その遺伝子発現効率は、低く、さらに、遺伝子発現のレベルや期間などを制御することができないという欠点がある。また、遺伝子が導入されたことによる未知の作用発現も未だ解決されていない問題である。

要するに、上記のような問題点を解決するポイントは、血管新生誘導因子の徐放化にある。遺伝子を用いて細胞から細胞増殖因子を分泌させ、その徐放効果を得ようとする理由は、血管新生誘導因子を水溶液の形態で投与した場合には、血管新生誘導因子の作用発現は、全く認められないこと、及び、血管新生誘導因子自身を徐放化することができないことにある。

しかし、本発明のように、細胞増殖因子を徐放化することができれば、遺伝子を用いる方法を選択する意味はなく、上記のような問題点を解決することができる。

本願発明者は、驚くべきことに、血管新生誘導因子及びゼラチンヒドロゲルを含み、血管新生誘導因子が徐放される製剤が、上肢又は下肢における虚血の治療に有用であること、さらに、この製剤を用いる治療法が、従来公知の治療法に比べて、侵襲性が低いこと及び側副血行の発達によって重症上肢又は下肢の血流をより強力に増加させることを見い出し、本発明を完成させたものである。

発明の開示

したがって、本発明の目的は、血管新生誘導因子及びゼラチンハイドロゲルを含み、血管新生誘導因子が徐放される、虚血治療剤を提供することである。

本発明で使用されるゼラチンとは、以下の物性：

(1) コラーゲンからのアルカリ加水分解処理によって得られる、酸性ゼラチンであり、

(2) 分子量が、SDS-PAGEの非還元条件下で約10～約20万ダルトンであり、

(3) 水溶液中のジータ電位が、約-15～約-20mVであるを有するゼラチンであり、市販のゼラチンとは異なるものである。

市販のゼラチンとして例えば、シグマ社製タイプAゼラチン、和光社製ゼラチンがあるが、水溶液中のジータ電位が以下のように異なっている。

シグマ社製タイプAゼラチン：約0～約5mV

和光社製ゼラチン：約-5～約-2mV

ジータ電位は、物質（ゼラチン）の静電的な荷電の程度を表す尺度であり、本発明におけるHGFと静電的複合体を形成するゼラチンの指標としては好適なものであると考えられる。

本発明のゼラチンは牛を始めとする各種の動物種の皮膚・腱などの部分あるいはコラーゲンあるいはコラーゲンとして用いられている物質からアルカリ加水分解して得られるものである。好ましくは、ウシの骨由来のI型コラーゲンをアルカリ処理して調製した酸性ゼラチンであり、新田ゼラチン社の試料等電点(IEP) 5.0として入手することもできる。なお、酸処理して調製した塩基性ゼラチンは同じく新田ゼラチン社の試料 IEP9.0として入手することができるが、

ジータ電位は以下のように大きく相違する。

酸性ゼラチン（新田ゼラチン社試料 IEP5.0）：約 -15 ～約 -20 mV

塩基性ゼラチン（新田ゼラチン社試料 IEP9.0）：約 $+12$ ～約 $+15$ mV

本発明で使用するゼラチンヒドロゲルとは、上記ゼラチンを用いて種々の化学的架橋剤と縮合させて得られるヒドロゲルのことである。化学的架橋剤としては、例えばグルタルアルデヒド、例えばEDC等の水溶性カルボジイミド、例えばプロピレンオキサイド、ジエポキシ化合物、縮合剤を用いることができる。好ましいものとしては、グルタルアルデヒドを用いることが挙げられる。

また、ゼラチンは、熱処理又は紫外線照射によっても架橋化することもできる。

ゼラチンヒドロゲルの形状は、特に制限はないが、例えば、円柱状、角柱状、シート状、ディスク状、球状、粒子状などがある。円柱状、角柱状、シート状、ディスク状のものは、通常移植片として用いられることが多く、また、球状、粒子状のものは注射投与も可能である。

円柱状、角柱状、シート状、ディスク状のゼラチンヒドロゲルは、ゼラチン水溶液に架橋剤水溶液を添加するか、あるいは、架橋剤水溶液にゼラチンを添加し、所望の形状の鑄型に流し込んで、架橋反応させることにより調製することができる。また、成形したゼラチンゲルにそのまま、あるいは乾燥後に架橋剤水溶液を添加してもよい。架橋反応を停止させるには、エタノールアミン、グリシン等のアミノ基を有する低分子物質に接触させるか、あるいは、pH2.5以下の水溶液を添加する。得られたゼラチンヒドロゲルは、蒸留水、エタノール、2-プロパノール、アセトン等により洗浄し、製剤調製に供される。

球状、粒子状のゼラチンヒドロゲルは、例えば、三口丸底フラスコに固定した攪拌用モーター（例えば、新東科学社製、スリーワンモーター、EYELA miniD.C. スターラー等）とテフロン（登録商標）用プロペラを取り付け、フラスコと一緒に固定した装置にゼラチン溶液を入れ、ここにオリーブ油等の油を加えて200～600 rpm程度の速度で攪拌し、W/O型エマルジョンとし、これに架橋剤水溶液を添加するか、ゼラチン水溶液を予めオリーブ油中にて前乳化（例えば、ボルテックスミキサーAdvantec TME-21、ホモジナイザー、polytron PT10-35等を用いて）しておいたものをオリーブ油中に滴下し、微粒子化した

W/O型エマルジョンを調製し、これに架橋剤水溶液を添加して架橋反応させ、遠心分離によりゼラチンヒドロゲルを回収した後、アセトン、酢酸エチル等で洗浄し、さらに2-プロパノール、エタノール等に浸漬して架橋反応を停止させることにより、調製することができる。得られたゼラチンヒドロゲル粒子は、2-
5 プロパノール、Tween 80を含む蒸留水、蒸留水等で順次洗浄し、製剤調製に供される。

ゼラチンヒドロゲル粒子が凝集する場合には、例えば、界面活性剤などの添加あるいは超音波処理（冷却下、1分以内程度が好ましい）等を行ってもよい。

尚、前乳化することによって、粒子サイズが20 μ m以下の微粒子状のゼラチン
10 ヒドロゲルを得ることができる。

得られるゼラチンヒドロゲル粒子の平均粒径は、1～1000 μ mであり、目的に応じて適宜必要なサイズの粒子をふるい分けて使用すればよい。

球状、粒子状のゼラチンヒドロゲルを調製する別法として以下の方法も挙げられる。

15 上記の方法と同様の装置にオリーブ油を入れ、200～600 rpm 程度の速度で攪拌し、ここにゼラチン水溶液を滴下してW/O型エマルジョンを調製し、これを冷却後、アセトン、酢酸エチル等を加えて攪拌し、遠心分離によりゼラチン粒子を回収する。回収したゼラチン粒子を、さらにアセトン、酢酸エチル等、次いで2-プロパノール、エタノール等で洗浄後、乾燥させる。この乾燥ゼラチン
20 粒子を0.1% Tween 80を含む架橋剤水溶液に懸濁させ、緩やかに攪拌しながら架橋反応させ、使用した架橋剤に応じて0.1% Tween 80を含む100 mMグリシン水溶液又は0.1% Tween 80を含む0.004 N HCl等にて洗浄し、架橋反応を停止することによりゼラチンヒドロゲル粒子を調製することができる。本法で得られるゼラチンヒドロゲル粒子の平均粒径は上記
25 の方法の場合と同様である。

この徐放のメカニズムは、血管新生誘導因子が、ハイドロゲル内のゼラチンに物理的に固定化されていることに基づく。この状態では、因子は、ハイドロゲルから放出されない。ハイドロゲルが分解されることによって、ゼラチン分子が、水可溶性となれば、それに伴って、固定化されている血管新生誘導因子が、放出

されるようになる。すなわち、ハイドロゲルの分解によって、血管新生誘導因子の徐放性を制御することができる。ハイドロゲルの分解性は、ハイドロゲル作成時での架橋程度によって変えることができる。

架橋反応条件は特に制限はないが、例えば、0～40℃、1～48時間で行うことができる。

本発明のゼラチンヒドロゲルは、その含水率が血管新生誘導因子の徐放性に大きく影響することが明らかとなっており、好ましい徐放性効果を示す含水率としては約80～99w/w%が挙げられる。さらに好ましいものとしては、約95～98w/w%のものが挙げられる。この架橋度の測定可能な指標に含水率がある。含水率が大きければ架橋度は低くなり、分解されやすくなる。つまり、この含水率の値が血管新生誘導因子の徐放（徐々に放出）を左右する。

本発明のゼラチンヒドロゲルは適宜、適当な大きさ及び形に切断後凍結乾燥し滅菌して使用することができる。凍結乾燥は、例えば、ゼラチンヒドロゲルを蒸留水に入れ、液体窒素中で30分以上、又は－80℃で1時間以上凍結させた後に、凍結乾燥機で1～3日間乾燥させることにより行うことができる。

ゼラチンヒドロゲルを調製する際のゼラチンと架橋剤の濃度は、所望の含水率に応じて適宜選択すれば良いが、ゼラチン濃度は、1～20w/w%、架橋剤濃度は、0.01～1w/w%が挙げられる。

本発明で使用される血管新生誘導因子は、公知物質であり、生化学試薬あるいは医薬として使用できる程度に精製されたものであれば、種々の方法で調製されたものを用いることができ、また既に市販されている製品（例えば、フィブラストスプレー（R）等）を使用してもよい。血管新生誘導因子の製造法としては、例えば、血管新生誘導因子を産生する初代培養細胞や株化細胞を培養し、培養上清等から分離、精製して血管新生誘導因子を得ることができる。あるいは遺伝子工学的手法により血管新生誘導因子をコードする遺伝子を適切なベクターに組み込み、これを適当な宿主に挿入して形質転換し、この形質転換体の培養上清から目的とする組換え誘導因子を得ることもできる。上記の宿主細胞は特に限定されず、従来から遺伝子工学的手法で用いられている各種の宿主細胞、例えば大腸菌、酵母又は動物細胞などを用いることができる。このようにして得られた誘導因子

は、天然型誘導因子と実質的に同じ作用を有する限り、そのアミノ酸配列中の1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失及び／又は付加されていてもよく、また同様に糖鎖が置換、欠失及び／又は付加されていてもよい。

本発明で使用される血管新生誘導因子は、新たな毛細血管の形成を促進する活性を有するものであれば、いずれを用いることもできるが、たとえば、塩基性線維芽細胞増殖因子(basic fibroblast growth factor: b F G F)血管内皮細胞増殖因子(V E G F、vascular endothelial growth factor)、肝細胞増殖因子(H G F、hepatocyte growth factor)、アンジオポエチン、血小板由来増殖因子(P D G F、platelet derived growth factor)、エフリンが挙げられる。

本発明における血管新生誘導因子徐放性ゼラチンヒドロゲル製剤とは、上記の酸性ゼラチンヒドロゲルに誘導因子を含浸させて得られる製剤である。血管新生誘導因子は塩基性タンパク質であるため、酸性ゼラチンヒドロゲルと複合体を形成するが、前述の溶液中のイオン強度変化に対するb F G Fの収着抑制効果を考慮すると、この血管新生誘導因子ゼラチン(ヒドロゲル)複合体は静電的相互作用だけでなく、疎水結合等の他の相互作用が大きく寄与している。この複合体の解離定数(K d) およびゼラチンに対する誘導因子の結合モル比はスキャッチャード結合モデル(Scatchard, G. 1949)にしたがって得られる。たとえば、ゼラチンに対するb F G Fの結合モル比として、およそb F G F分子1個が酸性ゼラチン分子1個に結合している。

また、37℃の酸性ゼラチンのK d値は、 5.5×10^{-7} Mであり、これは、20℃の硫酸ヘパリンのK d値 $1 \times 10^{-9} \sim 2.0 \times 10^{-10}$ Mよりも約2～3次数大きい(Rahmoune, H ら 1998 年)。これは、b F G Fゼラチン複合体の結合性がb F G Fヘパリン硫酸ほど強固でなく、緩やかであることを示している。

ゼラチンに対する血管新生誘導因子、たとえば、b F G Fのモル比を約1:1以上に上げた場合には、b F G Fの遊離が起きやすく活性的にはほとんど遊離のb F G Fと同様の挙動を示す。しかし、b F G Fのモル比を約1:1以下に下げた場合には、b F G Fが吸着され解離するものが少なくなるため、b F G Fの見かけの活性は低下するように見える。

従って、血管新生誘導因子とゼラチンあるいはゼラチンヒドロゲルとの複合体

は、血管新生誘導因子とゼラチンのモル比が種々に変化したものを作り得るが、初期バーストを回避するためには、好適なものとして、ゼラチンヒドロゲル1モルに対して血管新生誘導因子が約1モル以下のモル比の複合体が挙げられる。

5 なお、ゼラチンに対しては、血管新生誘導因子の重量比が約5倍量以下のものが好適である。さらに好適なものとしては、ゼラチンに対して血管新生誘導因子が約5～約 $1/10^4$ 倍量の重量比のものが望ましい。

10 本発明の血管新生誘導因子徐放性ゼラチンヒドロゲル製剤は、血管新生誘導因子の徐放性効果及び安定化効果を持つため、血管新生誘導因子の機能を少量で長時間にわたって発揮し得る。そのため、血管新生誘導因子の本来的機能である血管新生の促進、再還流障害の防止、線維化の抑制などの心血管保護作用が効果的に発揮される。

 本発明の血管新生誘導因子ゼラチンヒドロゲル製剤は、注射用製剤として、非経口的に使用することができる。例えば、皮下、筋肉内、静脈内、体腔内、結合組織内、骨膜内あるいは障害臓器等に投与することができる。

15 本発明の血管新生誘導因子徐放性ゼラチンヒドロゲル製剤あるいはその複合体は、それぞれの用途に応じて適宜剤型を工夫することができる。例えば、シート状、スティック状、粒子状、ロッド状、ペースト状の剤型にして投与することができる。投与方法としては、皮内投与、皮下投与、筋肉内投与、体腔内投与、結合組織内投与、骨膜内投与などが考えられる。

20 本発明製剤中の血管新生誘導因子の投与量は、疾患の重篤度、患者の年齢、体重等により適宜調整することができるが、通常成人患者当たり約0.1～約500 μ gの範囲、好ましくは、約1～約100 μ gの範囲から投与量が選択され、これを患部またはその周辺部位に注入することができる。また1回の投与で効果が不十分であった場合は、該投与を複数回行うことも可能である。

25 本発明による製剤は、血管外科領域における虚血の治療に適用することができる。好ましくは、閉塞性動脈硬化症、バージャー病、及び糖尿病及び膠原病に合併する末梢循環不全よりなる群から選択される疾患に伴う虚血である。

 本発明による製剤は、末梢循環不全による虚血の治療に適用することができるが、好ましくは、上肢又は下肢における虚血である。

図面の簡単な説明

図1は、無治療群であるグループAにおける、自然経過での側副血行の発達を示す。個体差はあるものの、無治療であっても内因性の増殖因子による側副血行の発達が認められる。preは治療前、postは治療後4週間を表す。

図2は、ゼラチンヒドロゲルのみを投与した群であるグループBにおける側副血行の発達を示す。グループAにおいて認められるのと同様の程度の側副血行の発達が認められる。preは治療前、postは治療後4週間を表す。

図3は、bFGF (30 μ g) 含有ゼラチンヒドロゲルを投与した群であるグループCにおける側副血行の発達を示す。bFGF投与により側副血行路の明瞭化が認められる。preは治療前、postは治療後4週間を表す。

図4は、bFGF (100 μ g) 含有ゼラチンヒドロゲル投与した群であるグループDにおける側副血行の発達を示す。bFGF投与により明らかな側副血行、血管の増生が認められる。preは治療前、postは治療後4週間を表す。

図5は、大腿部において採取された筋肉の組織標本を表す（ヘマトキシリン-エオシン染色、倍率20倍）。グループAとグループDとを比較すると、グループDにおいては毛細血管の増生が盛んであるのに対し、グループAにおいては毛細血管の増生が乏しいことが観察される。

図6は、各グループ間の毛細血管密度（単位面積あたりの毛細血管の数）を表す。FGFの用量に依存した毛細血管密度の有意な増加が認められる（危険率：グループA対D $p < 0.0001$ 、グループB対D $p < 0.0001$ 、グループC対D $p < 0.0001$ 、グループA対C $p < 0.05$ ）。

実施例

A. bFGF含有ゼラチンヒドロゲルの調製

bFGFを含有するゼラチンヒドロゲルは、WO 94/27630に記載の方法にしたがって調製した。具体的には、等電点が4.9のアルカリ処理ゼラチン水溶液（10 wt %、20 ml）とオリーブオイル（5 ml）の混合物を40℃で予熱し、1分間攪拌し、調製したエマルジョンを氷冷下で天然ゼラチンを除いた後、

アセトンを加え、さらに1時間4℃で攪拌した。得られたゼラチン粒子をアセトン（4℃）で3回洗浄し、遠心分離（5000rpm、4℃、5分間）により回収した。

得られた未架橋ゼラチン粒子（20mg）を、グルタルアルデヒド（0.13wt%）を含むTween80の水溶液（0.1%、20ml）に懸濁させ、4℃、24時間攪拌することによって架橋反応を行った。遠心分離（5000rpm、4℃、5分間）により回収した後、グリシン水溶液（20ml、10mM）中、37℃で1時間攪拌し、蒸留水で3回洗浄した後、凍結乾燥させた。得られた架橋ゼラチン粒子の平均粒径は、10 μ mであった。また、含水率は、95w/w%であった。

bFGFは、WO87/01728の図4に記載のヒトbFGFを用い、2mgの凍結乾燥ゼラチン粒子にbFGF水溶液（5mg、20 μ l）を滴下し、室温で1時間放置することによって架橋ゼラチン粒子内に含浸させた。

B. 閉塞性動脈硬化症（ASO）ウサギモデルを用いた研究

1) ASOウサギモデルの作製

体重2.5～3.5kgのJapanese white rabbit（雄、清水実験材料株式会社より購入）を用いて、静脈麻酔及び局所麻酔下に、右側後脚の総大腿動脈を中枢側で結紮し、さらに末梢側へ約2cmにわたり剥離し、総大腿動脈を末梢側でも結紮を行い、中間部を完全に切除し、ASOモデルを調製した。

ヒトのASOは、慢性疾患であることから、それに相当する状態を構築するために2週間の経過観察期間をおいた。

2) bFGF含有ゼラチンヒドロゲルによる治療方法

手術後2週間目に全症例を対象に患側後脚の血管造影検査を行い、治療後の下肢血行状態との評価の対照に用いた。血管造影検査後、以下の4つのグループに分けて異なった治療を行った。

グループA（n=6）：無治療（コントロール群）

グループB（n=6）：ゼラチンヒドロゲルのみ投与

グループC（n=6）：bFGF（30 μ g）含有ゼラチンヒドロゲル投与

与

グループD (n = 6) : b F G F (1 0 0 μ g) 含有ゼラチンヒドロゲル
投与

投与条件は、患側後脚の大腿部における筋注による投与、b F G F への4週間の徐放による局所での暴露と設定した。

5 3) 評価

4週間の治療期間後に、患側後脚の血管造影検査を行い、患側後脚大腿部の筋肉を採取し、組織学的評価を行った。

 i) 血管造影評価

各グループの側副血行の発達を比較した。

10 無治療群であるグループAにおいては、個体差はあるものの、無治療であっても内因性の増殖因子による側副血行の発達が認められた。ゼラチンヒドロゲルのみを投与した群であるグループBにおいては、グループAにおいて認められるのと同様の程度の側副血行の発達が認められた。b F G F (3 0 μ g) 含有ゼラチンヒドロゲルを投与した群であるグループCにおいては、b F G F 投与により側
15 副血行路の明瞭化が認められた。b F G F (1 0 0 μ g) 含有ゼラチンヒドロゲル投与した群であるグループDにおいては、b F G F 投与により明らかな側副血行、血管の増生が認められた。

 ii) 組織学的評価

20 大腿部において採取された筋肉の組織標本（ヘマトキシリン－エオシン染色、倍率20倍）を図5に示した。グループDにおいては毛細血管の増生が盛んであるのに対し、グループAにおいては毛細血管の増生が乏しいことが観察される。また、各グループ間の毛細血管密度（単位面積あたりの毛細血管の数）は、b F G F の用量に依存して有意に増加した（図6）。

請 求 の 範 囲

1. 血管新生誘導因子及びゼラチンハイドロゲルを含み、血管新生誘導因子が徐放される、虚血治療剤。

5 2. ゼラチンが、以下の物性：

(1) コラーゲンからのアルカリ加水分解処理によって得られる、酸性ゼラチンであり、

(2) 分子量が、SDS-PAGEの非還元条件下で約10～約20万ダルトンであり、

10 (3) 水溶液中のジータ電位が、約-15～約-20mVである
を有する、請求の範囲第1項記載の虚血治療剤。

3. 血管新生誘導因子が、塩基性線維芽細胞増殖因子、血管内皮細胞増殖因子及び肝細胞増殖因子よりなる群から選択される、請求の範囲第1項又は2項記載の虚血治療剤。

15 4. 虚血が、閉塞性動脈硬化症、パージャーマー病、及び糖尿病及び膠原病に合併する末梢循環不全よりなる群から選択される疾患に伴う虚血である、請求の範囲第1～3項のいずれか1項記載の虚血治療剤。

5. 虚血が、上肢又は下肢における虚血である、請求の範囲第1～4項のいずれか1項記載の虚血治療剤。

1 / 6

図 1

post



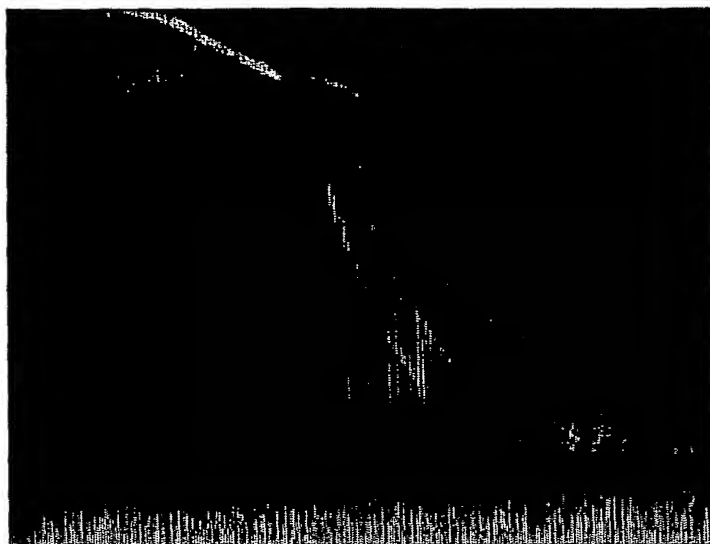
pre



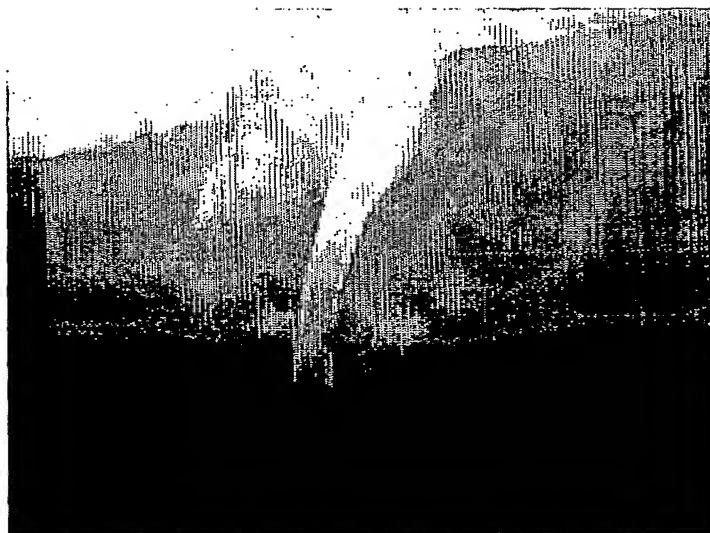
2 / 6

図 2

post

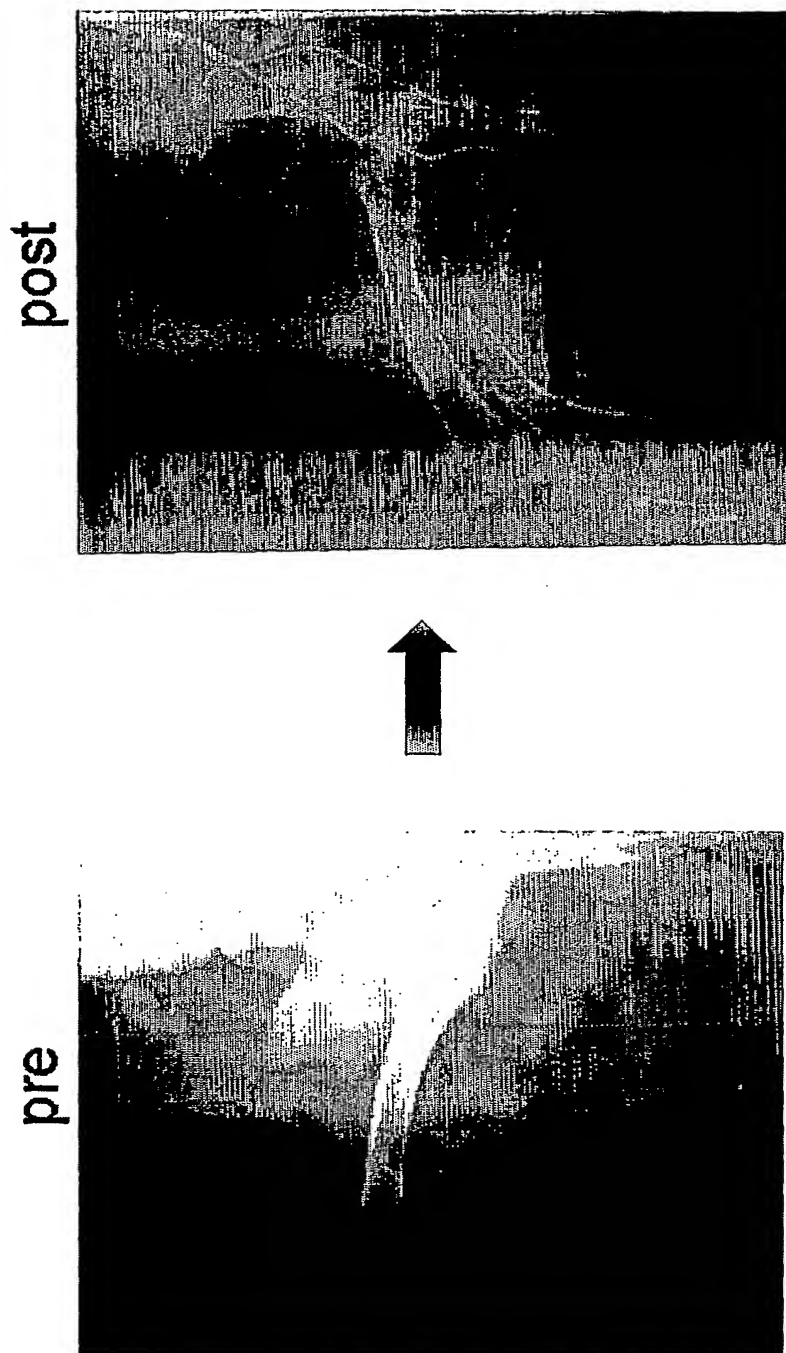


pre



3 / 6

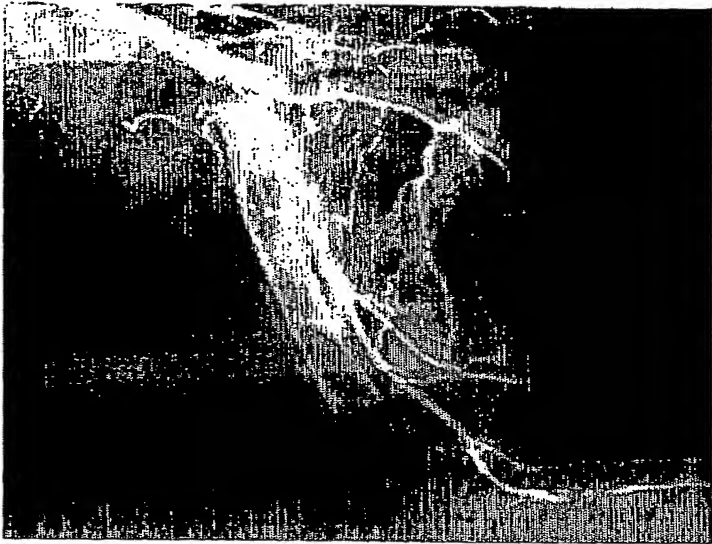
図 3



4 / 6

図 4

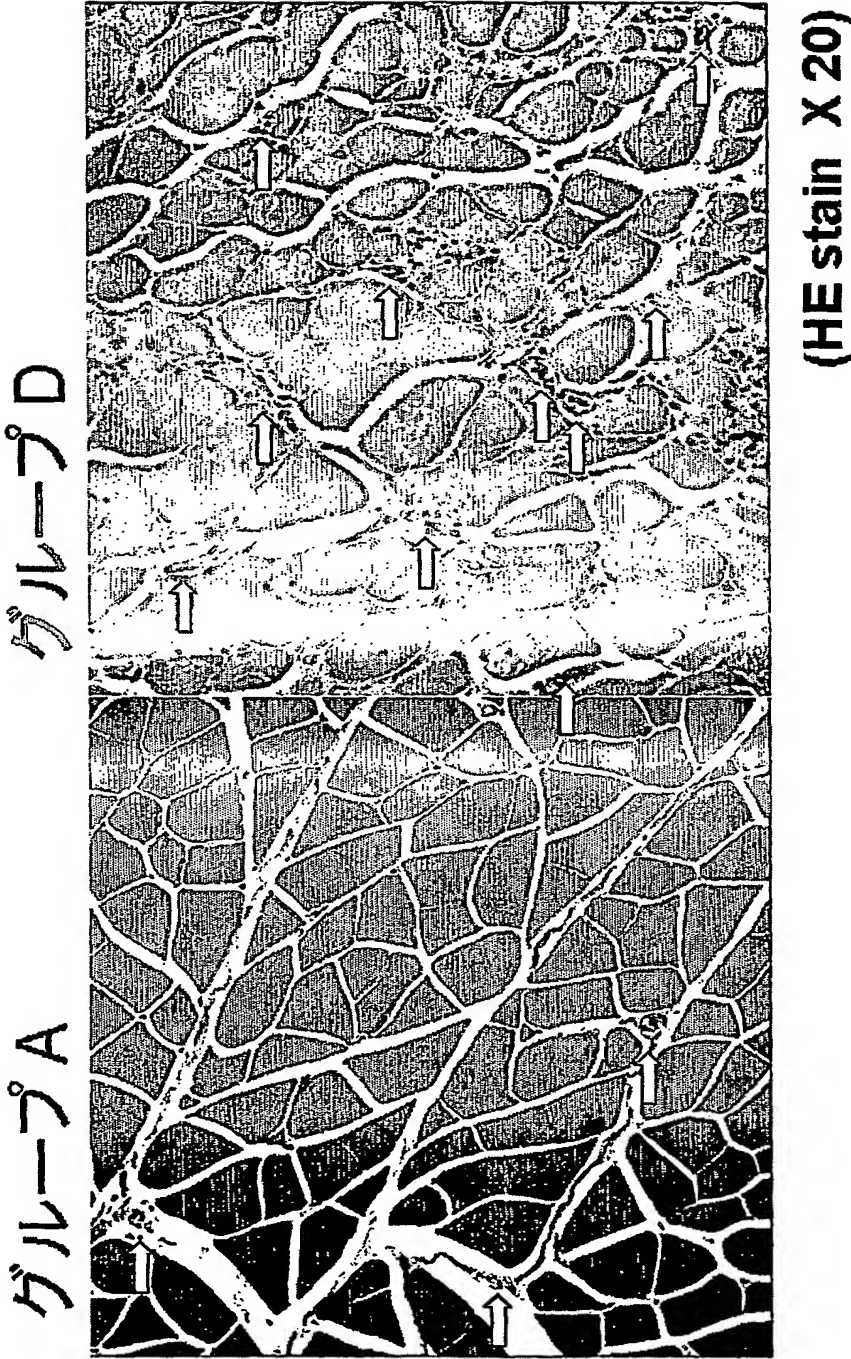
post



pre

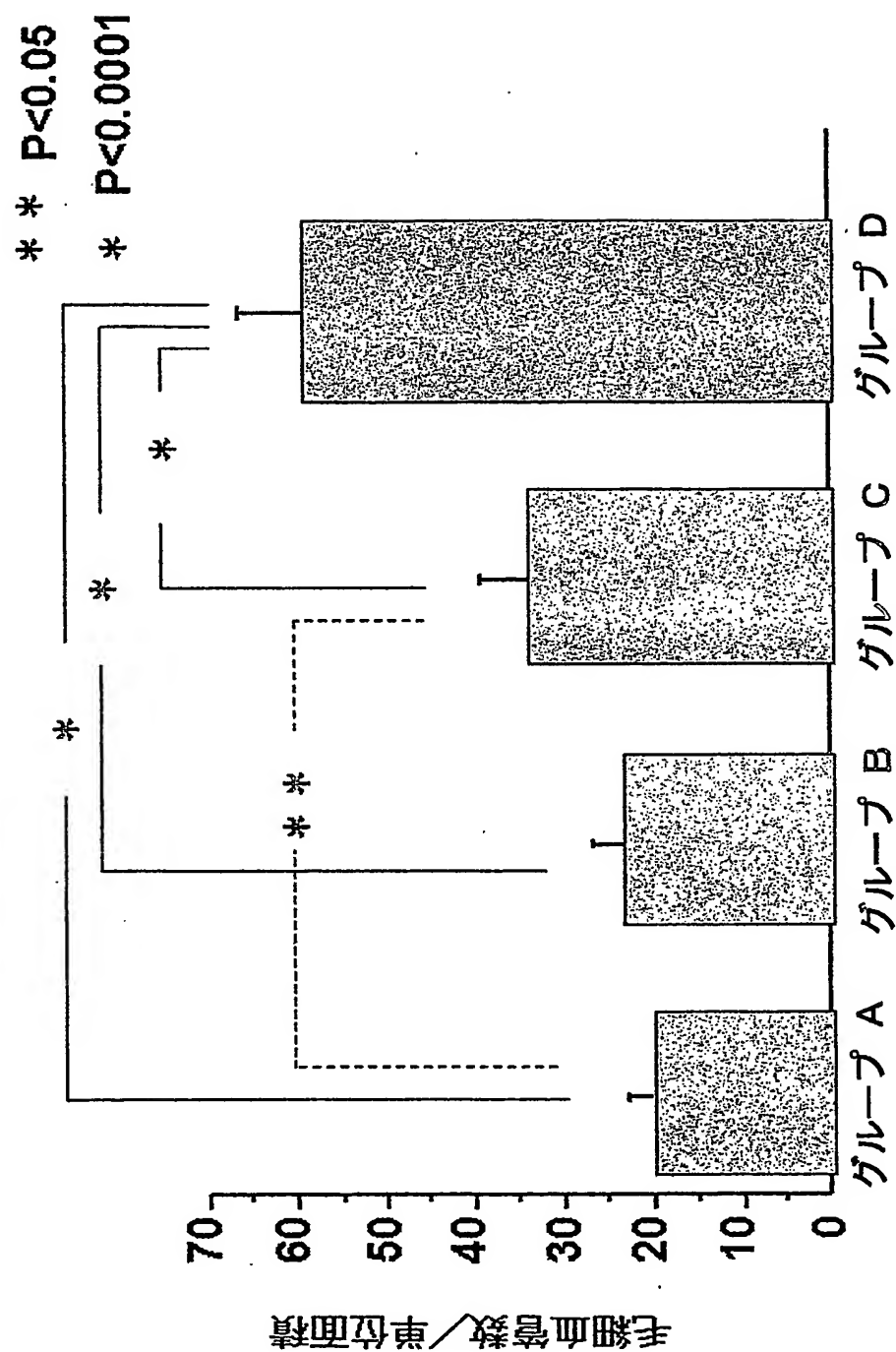


図 5



6 / 6

図 6



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/04165

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K38/18, A61K38/19, A61K47/42, A61P9/00, A61P9/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K38/00, A61K47/42, A61P9/00, A61P9/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAPLus (STN), BIOSIS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), WPI (DIALOG),
JOIS (JICST FILE)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Yasuhiko TABATA, "Tissue Engineering no tame no Saibo Zoshoku Inshi no Hoshutsu Seigyo", Associates of Keipcord Inc., 15 January, 2003 (15.01.03), Vol.21, No.1, pages 13 to 23, full text; particularly, pages 18 to 19	1-5
X	Masaya YAMAMOTO et al., "Kekkan Shinsei o Yudo shita Kyoketsu Shinkin no Saibo Ishoku Chiryo", Ensho-Saisei, 2002, Vol.22, No.3, pages 187 to 193, full text; particularly, on and after page 90	1-5
X	Yasuhiko TABATA, "Saisei Igaku no Genjo to Tenbo Saibo Seicho Inshi no Johoka", Bio Clinica, 2000, Vol.15, No.14, pages 1093 to 1097, full text; particularly, on and after page 20, right column	1-5

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or of which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
18 June, 2003 (18.06.03)

Date of mailing of the international search report
08 July, 2003 (08.07.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/04165

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2002-145797 A (KOMEDA M), 22 May, 2002 (22.05.02), (Family: none)	1-5
X	Hiroshi SAKAKIBARA et al., "Shinzo Kekkan-kei Ryoiki ni okeru Drug Delivery System no Oyo", Gene & Medicine, 2002, Vol.6, No.3, pages 395 to 399, full text; particularly, on and after page 397, left column 1	1-5
X	Yasuhiko TABATA, "IV. Seitai Kogaku Gijutsu Drug Delivery System", tanpakushitsu Kakusan Koso, 2000, Vol.45, No.13, pages 2179 to 2187, full text; particularly, page 2182, right column, lines 15 to 35; page 2183, left column IV. to page 2185, right column, line 18	1-5
X	Masaya YAMAMOTO et al., "Polyion-Complex o Riyo shita Hydrogel kara no Shushu no Saibo Zoshoku Inshi no Johoka", Drug Delivery System, 1999, Vol.14, No.6, pages 506 to 510	1-5
X	Keiichi FUKUDA et al., "Tokushu Junkanki Ryoiki ni okeru Saisei Genjo to Tenbo", Medical Tribune, 2002, Vol.35, No.9, pages 38 to 40; page 39, column 4 to page 40, column 1	1-5
X	Yasuhiko TABATA et al., "Basic FGF to Saibo Ishoku o Mochiita Kyobu Geka Ryoiki no Saisei Igaku", Japanese Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery, 2001, Vol.49 special extra issue, page 145 PD2-2	1-5
X	Yasuhiko TABATA, "Tokushu Saibo Kogaku kara Soshiki Kogaku Zoki Kogaku eno Tenkai Saibo Seicho Inshi no Hoshutsu Seigyo to Kekkan Shinsei", The Tissue Culture Engineering, 2001, Vol.27, No.10, pages 372 to 375, full text; particularly, on and after page 373	1-5
X	SAKAKIBARA, Y. et al., "Prevascularization with gelatin micro spheres containing basic fibroblast growth factor enhances the benefits of cardiomyocyte transplantation.", J.Thoracic and Cardiovascular Surgery, July 2002, Vol.124, No.1, pages 50 to 56	1-5
X	YAMAMOTO, M. et al., "Improved therapeutic efficacy in cardiomyocyte transplanation for myocardial infarction with release system of basic fibroblast growth factor.", Artif.Organs., February 2003, Vol.27, No.2, pages 181 to 184	1-5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/04165

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	IWAKURA, A. et al., "Basic fibroblast growth factor may improve devascularized sternal healing", Ann.Thorac.Surg., 2000, Vol.70, pages 824 to 828	1-5
X	IWAKURA, A. et al., "Novel method to enhance sternal healing after harvesting bilateral internal thoracic arteries with use of basic fibroblast growth factor", Circulation, 2000, Vol.102, No.19 suppl.3, p.III-307-III-311	1-5
X	TABATA, Y. et al., "Vascularization effect of basic fibroblast growth factor released from gelatin hydrogels with different biodegradabilities", Biomaterials, 1999, Vol.20, pages 2169 to 2175	1-5

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K38/18, A61K38/19, A61K47/42, A61P9/00, A61P9/10

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K38/00, A61K47/42, A61P9/00, A61P9/10

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), BIOSIS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), WPI (DIALOG), JOIS (JICSTファイル)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	田畑泰彦 ‘ティッシュエンジニアリングのための細胞増殖因子の放出制御’ 生体材料, 15 Jan. 2003, vol. 21, no. 1, p. 13-23 文献全体、特にp. 18-19	1-5
X	山本雅哉他 ‘血管新生を誘導した虚血心筋の細胞移植治療’ 炎症・再生, 2002, vol. 22, no. 3, p. 187-193 文献全体、特にp. 190以降	1-5

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

X* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

18.06.03

国際調査報告の発送日

08.07.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

大久保元浩

4C

8828

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	田畑泰彦 ‘再生医学の現状と展望 細胞成長因子の徐放化’ Bi o Clinica, 2000, vol.15, no.14, p.1093-1097 文献全体、特に p.20右欄以降	1-5
X	JP 2002-145797 A (KOMEDA M) 2002.05.22 (FAMILY: NONE)	1-5
X	榊原裕他 ‘心臓血管系領域におけるドラッグデリバリーシステム の応用’ 遺伝子医学, 2002, vol.6, no.3, p.395-399 文献全 体、特にp.397左欄1. 以降	1-5
X	田畑泰彦 ‘IV. 生体工学技術 ドラッグデリバリーシステム’ 蛋白質 核酸 酵素, 2000, vol.45, no.13, p.2179-2187 文献全 体、特にp.2182右欄第15-35行、p.2183左欄IV. -p.2185右欄第18行	1-5
X	山本雅哉他 ‘ポリイオンコンプレックスを利用したヒドロゲルか らの種々の細胞増殖因子の徐放化’ Drug Delivery System, 199 9, no.14, no.6, p.506-510	1-5
X	福田恵一他 ‘特集 循環器領域における再生医療の現状と展望’ Medical Tribune, 2002, vol.35, no.9, p.38-40 p.39第4欄 -p.40第1欄	1-5
X	田畑泰彦他 ‘Basic FGF と細胞移植を用いた胸部外科領域の再生 医学’ Japanese Journal of Thoracic and Cardiovascular Surg ery, 2001, vol.49増刊, p.145 PD2-2	1-5
X	田畑泰彦 ‘特集 細胞工学から組織工学・臓器工学への展開 細 胞成長因子の放出制御と血管新生’ 組織培養工学, 2001, vol.2 7, no.10, p.372-375 文献全体、特にp.373以降	1-5
X	SAKAKIBARA, Y. et al. ‘Prevascularization with gelatin micro spheres containing basic fibroblast growth factor enhances t he benefits of cardiomyocyte transplantation.’ J.Thoracic a nd Cardiovascular Surgery, Jul.2002, vol.124, no.1, p.50-56	1-5

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	YAMAMOTO, M. et al. 'Improved therapeutic efficacy in cardiomyocyte transplantation for myocardial infarction with release system of basic fibroblast growth factor.' Artif. Organs., Feb. 2003, vol. 27, no. 2, p. 181-184	1-5
X	IWAKURA, A. et al. 'Basic fibroblast growth factor may improve devascularized sternal healing.' Ann. Thorac. Surg., 2000, vol. 70, p. 824-828	1-5
X	IWAKURA, A. et al. 'Novel method to enhance sternal healing after harvesting bilateral internal thoracic arteries with use of basic fibroblast growth factor.' Circulation, 2000, vol. 102, no. 19 suppl. 3, p. III-307-III-311	1-5
X	TABATA, Y. et al. 'Vascularization effect of basic fibroblast growth factor released from gelatin hydrogels with different biodegradabilities.' Biomaterials, 1999, vol. 20, p. 2169-2175	1-5